

细胞周期机制在创伤性脑损伤中的研究进展

王国军^{1,2} 综述 李新钢² 审校

1. 山东省泰安市中心医院神经外科, 山东 泰安 271000

2. 山东大学齐鲁医院神经外科, 山东 济南 250012

摘要: 创伤性脑损伤后诱导继发性损伤, 导致神经元凋亡、神经炎症和神经功能障碍, 一个重要的损伤机制是细胞周期激活。细胞周期再进入机制可能是神经元凋亡性细胞死亡的共同通路, 通路可能是 p53 依赖性或非依赖性的。创伤性脑损伤也导致星形胶质细胞和小胶质细胞中细胞周期激活。细胞周期抑制剂, 在创伤性脑损伤后可以提供强有力的神经保护作用, 为颅脑损伤的治疗提供新的研究靶点。

关键词: 细胞周期; 创伤性脑损伤

创伤性脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 是一类致残率和致死率最高的疾病, 涉及到巨大的社会成本, 已构成当前社会一种重大的公共卫生问题^[1,2]。随着创伤急救体系的进展, TBI 治疗的总体水平不断提高。然而, 对于重型颅脑损伤的死亡率和致残率仍面临严峻的挑战。

细胞周期 (Cell cycle) 调控机制在有丝分裂细胞的发育、分化和增殖中是必须的过程。传统观念认为, 一旦分化为成年人的神经元永久性地进入细胞有丝分裂后期 (G0 期), 细胞周期因子不再发挥重要的生理学特征。但最近的研究表明, 在某些病理条件下, 细胞周期激活 (Cell Cycle Activation, CCA) 机制影响中枢神经系统的正常功能, 也参与了急性和慢性神经变形性疾病的病理生理过程, 如脑缺血^[3]、脑和脊髓损伤^[4,5]、阿尔兹海默病^[6]、帕金森病^[7]和肌萎缩侧索硬化^[8]等。TBI 后, 细胞周期的激活将导致迟发性神经元凋亡, 炎症反应和反应性胶质增生。

1 细胞周期通路及其机制

细胞周期是高度精确的过程, 控制和执行基因序列从 1 代细胞到次代细胞的复制和转录过程^[9]。细胞接收到有丝分裂信号, 进入 G1 期, 其中细胞对生长因子和其他环境信号进行应答, 为 S 期 DNA 复制做准备。随后进入 G2 期和 M 期。当细胞接受到停止活性生长的信号, 退出细胞周期, 进入到静止期 (G0 期) 成为静止细胞。在合适的条件下, 绝大多数新分裂为 G0 期细胞能够重新开始细胞

周期^[9]。细胞周期内源性调控主要是通过细胞周期蛋白 (Cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (CDKIs) 的网络而实现的。

1.1 Cyclins 和 CDKs

Cyclins 是一种依赖于细胞周期时相而合成或分解的激活蛋白, 并以时间依赖性模式调节激酶活性。有两种类型的周期蛋白: 有丝分裂期周期蛋白 (如 CyclinA, CyclinB) 和 G1 期周期蛋白 (如 CyclinC, CyclinD, CyclinE)。CDKs 是一种小型的丝氨酸/苏氨酸激酶 (30 ~ 35 kDa), 按照其发现的先后顺序分为 CDK1-9。除了 CDK3 和 CDK5 外, 其他的 CDKs 构成活性二聚体复合物, 通过结合 Cyclin 调节亚基而激活^[10]。

典型的 CDKs 包括 3 个分裂间期激酶 (CDK2, 4 和 6), 和一个分裂期激酶 (CDK1), CDKs 相互合作驱使细胞通过细胞周期^[10]。G1 早期通过增加 D 型 Cyclin 蛋白家族成员 (CyclinD1, D2 和 D3) 的水平而激活 CDK4 和 CDK6, 用以 Rb 家族成员的磷酸化和失活, 从 Rb 介导的抑制中释放转录因子的 E2 启动子结合因子 (E2F) 家族^[10,11]。可以通过降低 CyclinD 或增加 CyclinE1 和 CyclinE2 的水平而使 CDK2 激活, 调节 G1/S 期的转换。相反, CDK2 同 CyclinA 相互作用导致底物的磷酸化而促进 DNA 的合成。CDK1 被认为通过与 CyclinA 结合成复合物而被激活, 控制 S/G2 期的转换。CyclinA 被降解后, CDK1-CyclinB 复合物从胞浆转运到胞核内, 有

收稿日期: 2015-05-06; 修回日期: 2015-07-09

作者简介: 王国军 (1973-) 男, 在读博士, 副主任医师, 主要从事颅脑损伤的基础和临床研究。现工作单位为山东省泰安市中心医院神经外科。

通讯作者: 李新钢 (1959-) 男, 博士学位, 教授, 主要从事颅脑损伤的基础与临床研究。

助于促使细胞通过有丝分裂期。

1.2 CDKIs

CDK 抑制剂是一种小型多肽,通过形成一种无活性复合物或作为 CDKs 的配体,来阻断 Cyclin/CDK 的活性。内源性和外源性 CDK 抑制剂能够阻断细胞周期的进展。内源性抑制因子包括 2 个亚类:① Ink4 家族(包括 p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, 和 p19^{Ink4d});② Cip/Kip 家族(包括 p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}),而 P27 是一种在神经元内高度表达的因子^[5,10,12]。在视网膜和其他组织中的研究提示, Ink4 蛋白对 CDK4 和 CDK6 有特异性,能够阻止与 CyclinD 结合。然而, Cip/Kip 分子能够广泛的,非特异性阻断 CDKs 的活性。上述抑制剂在细胞发育中表达上调,也对抗有丝分裂刺激物有应答,结合 CDK/cyclin 复合物,阻止其活性发挥^[12]。最常用的外源性抑制剂包括夫拉平度、Roscovitine 和奥罗莫星。夫拉平度,是一种来源于印度植物 rohitukin 树皮的半合成的黄酮类物质,能够抑制所有的 CDKs^[13]。Roscovitine,是一种嘌呤类似物,选择性抑制 CDK2 和 CDK5 的激活。奥罗莫星,也是一种嘌呤类似物,通过竞争性结合 ATP 结合位点来抑制 CDK2 和 CDK5 的活性^[5]。

1.3 CDKs 的底物

在细胞周期的 G1 期, Rb 及其相关蛋白(包括 p107 和 p130)是 CDK4/6 和 CDK2 的原始底物。在静息期, Rb 为非磷酸化状态,且通过抑制 E2F 转录因子来阻止细胞周期的行进^[14]。随着促有丝分裂的刺激, Rb 通过活性的 CDK4/6/cyclinD 和 CDK2/cyclinE 复合物被磷酸化。pRb 从转录因子复合物 E2F/DP 中释放,随后激活 E2F 靶点基因,转换进入 S 期^[12]。

2 细胞周期机制在继发性脑损伤中作用

创伤性脑损伤通过机械性和继发性损伤的应答反应,引起组织丧失和有关神经功能障碍。继发性损伤机制包括神经元和少突胶质细胞的凋亡,炎症反应,以及反应性星形细胞胶质化^[15,16]。实验性证据支持 CCA 在每次创伤后事件中发挥了至关重要的作用,导致有丝分裂后细胞(成熟的少突胶质细胞和/或神经元)的凋亡,以及有丝分裂细胞(小胶质细胞和星形胶质细胞)的增殖^[4,17,18,23,24,26,27]。

2.1 CCA 与神经元凋亡

有丝分裂后细胞,如神经元,被认为永久性进入 G0 期,一旦分化后不能再次进入细胞周期。然

而,大量观察表明成人分化的有丝分裂后神经元能够重新进入(Re-Entry)细胞周期,而且一旦激活可导致凋亡而不是神经元的增殖^[17]。细胞周期再进入机制可能是神经元凋亡性细胞死亡的共同通路^[18]。一旦细胞周期被激活,转录因子 E2F1 表达增加,能够诱导神经元凋亡,其潜在的通路可能是 p53 依赖性或非依赖性的。在此情况下,多种线粒体依赖性通路可能被激活,包括 caspase 和 caspase 依赖性信号级联反应^[18]。许多研究证实,细胞周期蛋白直接激活凋亡级联家族成员。在 G1 期中一些激活 CDKs 的关键分子靶点是 Rb 家族成员(Rb, p107 和 p130)^[19]。在静止期神经元, Rb 家族成员结合转录因子的 E2F 家族成员(E2F 1-5),抑制 E2F 依赖性基因的表达,主要是通过直接阻止 E2F 激活结构域和/或通过招募染色质修饰蛋白到 E2F 结合点而实现。激活的 CDKs 使 Rb 蛋白家族磷酸化,导致 Rb-E2F 复合物的分离,使激活基因表达的 E2Fs 游离, E2F 调节基因失抑制^[19],导致促凋亡分子的转录增加,最终导致细胞死亡^[20]。

神经元中细胞周期蛋白的表达,除了导致神经元凋亡外,尚有增加突触可塑性以及 DNA 修复功能。Schmetsdorf 等^[21]报道,在胞浆内神经元特异性蛋白表达参与了细胞周期, CDKs 和 cyclins 在神经元内表达且定位于树突和细胞骨架。在分化的肌小管中 CDK2 对于 AChR ϵ 的表达是必须的,促进了突触的成熟。同时, Schwartz 等^[22]研究表明,不同浓度的神经毒性刺激可以诱导细胞周期蛋白的表达。低浓度的 H₂O₂ 诱导 G1 期细胞周期蛋白的表达,表达的蛋白具有 DNA 修复功能。然而,高浓度的 H₂O₂ 诱导细胞周期再进入,与 DNA 合成和凋亡有关。在神经元中 DNA 损害调节细胞死亡的进程,可能是通过共济失调毛细血管扩张突变(ATM)激活而实现的,涉及到细胞周期调节^[22]。因此,高度分化的神经元能够被诱导表达相当数量的细胞周期蛋白,启动 DNA 复制进程,最终导致细胞凋亡而非细胞分化增殖,或者说神经元凋亡是其企图进入细胞周期的计划流产所致。

2.2 CCA 与胶质细胞的增殖

TBI 不但引起神经元和少突胶质细胞凋亡,而且诱导胶质细胞相关炎症反应和反应性胶质增生,后者的改变导致组织丧失和胶质疤痕形成。由此提示, TBI 也导致星形胶质细胞和小胶质细胞中细

胞周期激活。

小胶质细胞参与许多中枢神经系统内稳态功能,包括突触可塑性和学习。TBI 后小胶质细胞在数小时内即可发生应答,并向病灶侧迁移。体内实验证实,在激光诱导的损伤后小胶质细胞快速增殖,网状的小胶质细胞向损伤区域迁移,在受损和健康组织间形成防御区域^[23-25]。作为对细胞损伤的应答,小胶质细胞转换为水母样的吞噬细胞。水母样小胶质细胞具有高度游动性,常常嵌入受损的胶质界膜代替死亡的星形胶质细胞,共同构成吞噬细胞屏障,这一应答依赖于嘌呤受体信号($P2X_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{12}$)和连接蛋白半通道^[26]。一方面,小胶质细胞的激活产生各种促炎症分子和其他生物活性因子,诸如 $IL-1\beta$, NO, 补体, ROS 等,提示诱导继发性损伤。另一方面,小胶质细胞相关因子如 $IL-10$ 和 $TNF-\beta$ 可能参与神经保护效应。小胶质细胞不但从受损脑组织内清除碎片,而且通过封闭死亡或受损星形细胞间的间隙而有助于维持胶质界膜的完整性。同样, TBI 引起星形胶质细胞激活,从一个静止的形态转化为更活性状态,导致继发性损伤。损伤后反应性星形胶质细胞能够变得肥大,胞体的延伸和肿胀。在损伤后常常观察到胶质疤痕的形成,其中由大量星形胶质细胞构成,伴随着小胶质细胞、内皮细胞、成纤维细胞以及细胞外基质^[24]。星形细胞胶质化的另一个突出的方面是星形胶质细胞能够向病灶或受损区域组织迁移或增殖。星形细胞胶质化具有神经保护和神经退化性变的双重作用。

3 细胞周期抑制在脑损伤中神经保护作用

细胞周期抑制剂已经被广泛用于癌症治疗的研究中,主要在于其潜在的控制细胞周期的作用^[10]。最常用的外源性抑制剂包括夫拉平度、Roscovitine 和奥罗莫星。细胞周期抑制剂作为癌症治疗药物已经用于人类临床试验,广泛应用于实体肿瘤和恶性血液系统肿瘤中。尽管目前尚无细胞周期抑制剂用于治疗 CNS 疾病的任何临床试验报道,但在许多啮齿类动物模型中已经证实外源性细胞周期抑制剂能够减轻神经元死亡,抑制胶质反应,和/或改善神经功能预后,起到神经创伤中的神经保护作用^[4, 13-23]。

为进一步证实 TBI 后创伤性神经元细胞死亡中细胞周期激活的重要作用,在创伤后早期(30 分钟内)经脑室内注入单剂量夫拉平度。研究证实,

夫拉平度治疗后不但减少了 Cyclin D1 和 caspases-3 阳性神经元的数量,而且小胶质细胞增殖/激活明显减弱,同时星形胶质细胞的增殖和胶质疤痕的形成也明显减少^[4]。Di Giovanni 等^[4]认为,在 TBI 后用夫拉平度治疗可以出现神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的三重效应,即病变体积的缩小,认知表现和运动功能的明显改善。TBI 后采用 Roscovitine 治疗,能够明显减少病变体积,改善行为预后^[27]。治疗减弱了神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中细胞周期激活,由此可导致神经元凋亡、胶质疤痕和小胶质细胞活化减少的效应。细胞周期抑制剂能够抑制 caspase-3 激活和神经元细胞死亡,减弱星形胶质细胞和小胶质细胞增殖,并降低神经毒性分子的释放^[4, 27]。考虑到他们的效应和长期治疗时间窗,细胞周期抑制剂似乎是临床创伤性脑损伤试验治疗有前景的候选者。

4 展望

TBI 后诱发继发性损伤,导致凋亡、神经炎症和神经功能障碍。一个重要的损伤机制是细胞周期激活,引起神经元凋亡和胶质细胞激活。细胞周期抑制剂的神经保护效应已经在多种试验性脑损伤动物模型中被证实。因此,抑制细胞周期的治疗可能具有明显的神经保护特征。目前, TBI 后治疗手段非常有限,寻找新的治疗靶点显得尤为重要,细胞周期在 TBI 中的正确理解及其抑制剂的进一步研究将为 TBI 的药物治疗提供广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Skolnick BE, Maas AI, Narayan RK, et al. A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*, 2014, 371(26): 2467-2476.
- [2] 李志涛, 闫华, 刘晔. 脑红蛋白在颅脑损伤中脑保护作用的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41(6): 580-582.
- [3] Osuga H, Osuga S, Wang F, et al. Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(18): 10254-10259.
- [4] Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, et al. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(23): 8333-8338.
- [5] Wu J, Stoica BA, Faden AI. Cell cycle activation and spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(2): 221-228.
- [6] Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's

- disease brain. *J Neurosci* ,1998 ,18(8) : 2801–2807.
- [7] Hoglinger GU , Breunig JJ , Depboylu C , et al. The pRb / E2F cellcycle pathway mediates cell death in Parkinson' s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2007 ,104 (9) : 3585–3590.
- [8] Ranganathan S , Bowser R. Alterations in G(1) to S phase cell–cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* ,2003 ,162(3) : 823–835.
- [9] Israels ED , Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells* ,2001 , 19(1) : 88–91.
- [10] Malumbres M , Barbacid M. Cell cycle , CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* , 2009 ,9(3) : 153–166.
- [11] Stoica BA , Byrnes KR , Faden AI. Cell cycle activation and CNS injury. *Neurotox Res* ,2009 ,16(3) : 221–237.
- [12] Yang Y , Herrup K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post–mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* ,2007 ,1772(4) : 457–466.
- [13] Newcomb EW , Tamasdan C , Entzminger Y , et al. Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy. *Cell Cycle* , 2004 ,3 (2) : 230–234.
- [14] Adams PD. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin /cdks. *Biochim Biophys Acta* ,2001 ,1471 (3) : M123–M133.
- [15] Keane RW , Kraydieh S , Lotocki G , et al. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001 ,21(10) : 1189–1198.
- [16] Corps KN , Roth TL , McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* ,2015 ,72 (3) : 355–362.
- [17] Herrup K , Yang Y . Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* ,2007 , 8(5) : 368–378.
- [18] Folch J , Junyent F , Verdaguer E. Role of cell cycle re–entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotox Res* ,2012 ,22(3) : 195–207.
- [19] Greene LA , Biswas SC , Liu DX . Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ* , 2004 ,11(1) : 49–60.
- [20] Wallace DM , Cotter TG. Histone deacetylase activity in conjunction with E2F–1 and p53 regulates Apaf–1 expression in 661 W cells and the retina. *J Neurosci Res* ,2008 ,87 (4) : 887–905.
- [21] Schmetsdorf S , Arnold E , Holzer M , et al. A putative role for cell cycle–related proteins in microtubule–based neuroplasticity. *Eur J Neurosci* ,2009 ,29(6) : 1096–1107.
- [22] Schwartz EI , Smilenov LB , Price MA , et al. Cell cycle activation in postmitotic neurons is essential for DNA repair. *Cell Cycle* , 2007 ,6(3) : 318–329.
- [23] Kabadi SV , Faden AI. Selective CDK inhibitors: promising candidates for future clinical traumatic brain injury trials. *Neural Regen Res* ,2014 ,9(17) : 1578–1580.
- [24] Silver J , Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* ,2004 ,5(2) : 146–156.
- [25] Davalos D , Grutzendler J , Yang G , et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* , 2005 , 8(6) : 752–758.
- [26] Corps KN , Roth TL , McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* , 2015 , 1; 72(3) : 355–362.
- [27] Hilton GD , Stoica BA , Byrnes KR , et al. Roscovitine reduces neuronal loss , glial activation , and neurologic deficits after brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2008 ,28 (11) : 1845–1859.